

AF

Method for obtaining active beta-NGF

Patentnummer: EP0994188

Bekendtgørelsesdato: 2000-04-19

Opfinder(e): GROSSMANN ADELBERT DR (DE); RUDOLPH RAINER DR (DE); SCHWARZ ELISABETH (DE); RATTENHOLL ANKE (DE)

Patenthaver(e): RUDOLPH RAINER DR (DE)

Ønsket Patent: WO0022119

Ansøgningsnummer: EP19980119077 19981009

Prioritet(er): EP19980119077 19981009

IPC Klasse: C12N15/12; C07K14/48

EC Klasse: C07K14/48

Tilsvarende: AU1034800, BR9914393

Sammendrag

Preparation of biologically active beta-NGF comprises denaturing its inactive insoluble proform followed by renaturation and pro-sequence cleavage. Preparation of biologically active beta -NGF from its inactive insoluble proform, obtained by recombinant preparation in prokaryotic cells comprises: (a) dissolving ProNGF in its inactive insoluble form in a denaturating solution ; (b) transferring into a non- or weak denaturing solution where the denatured proNGF assumes a biologically active conformation, determined by the presence of disulfide bridges occurring in natural beta -NGF; and (c) cleaving the pro-sequence to obtain the active beta -NGF followed by its isolation.

Data fra esp@cenet test databasen - I2

Beskrivelse

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von beta -NGF durch Naturierung von denaturiertem, inaktivem proNGF und Abspaltung der Prosequenz.

[0002] Nervenwachstumsfaktor (beta -NGF) ist ein neurotropher Faktor, der für das Wachstum und das Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen notwendig ist (R. Levi-Montalcini, Science 237, 1154 (1987); H. Thoenen und Y.-A. Barde, Physiol. Rev. 60, 1284 (1980); B. A. Yankner und E. M. Shooter, Annu. Rev. Biochem. 51, 845 (1982)). beta -NGF unterstützt ausserdem Wachstum, Differenzierung und Vitalität cholinriger Neuronen des zentralen Nervensystems (F.J. Hefti, J. Neurobiol. 25, 1418 (1994)). Mögliche therapeutische Indikationen für rekombinanen menschlichen Nervenwachstumsfaktor beinhalten periphere sensorische Neuropathien, z.B. bei Diabetes oder als mögliche Nebenwirkung bei der AIDS-Therapie. Weitere Indikationen für rh- beta -NGF stellen zentrale Neuropathien, z.B. die Alzheimersche Krankheit dar. Der Gedächtnisverlust wird hier durch den Verlust cholinriger Neuronen hervorgerufen.

[0003] Menschlicher beta -NGF wird als Präpro-Protein translatiert. Dieses besteht aus 241 Aminosäuren. Das Präpeptid (18 Aminosäuren) wird bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten, das entstandene Proprotein wird anschliessend N- und C-terminal prozessiert (Abspaltung der Prosequenz (103 Aminosäuren) und der letzten beiden Aminosäuren). Reifer humaner NGF besteht folglich aus 118 Aminosäuren. Er ist homolog zum Maus- beta -NGF und unterscheidet sich von diesem Protein lediglich durch 12 Aminosäureaustausche. Für die Durchführung klinischer Studien oder einen möglichen Einsatz als Therapeutikum müssen grosse Mengen homogenen beta -NGFs verfügbar sein. Eine natürliche Quelle grösserer Mengen dieses Faktors sind die Submaxillardrüsen männlicher Mäuse. Diese Präparationen sind jedoch heterogene Gemische verschiedener Dimerer und daher für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Ausserdem ist es wünschenswert, Patienten die humane Form des Proteins zu verabreichen. Neurotrope Faktoren sind aber nur in verschwindend geringen Konzentrationen im menschlichen Gewebe vorhanden.

[0004] Für den Einsatz von beta -NGF als Therapeutikum kommt deshalb nur die rekombinante Herstellung in Betracht. Hier bieten sich zwei Möglichkeiten an: die rekombinante Expression entweder in Zellkultur oder in Bakterien. Eukaryotische Zellexpressionssysteme liefern jedoch nur sehr geringe Proteink Mengen und sind verhältnismässig teuer (J. Barnett et al., J. Neurochem. 57, 1052 (1991); C. H. Schmelzer et al., J. Neurochem. 59, 1675 (1992); R. H. Edwards und W. J. Rutter, United States Patent No. 5,683,894).

[0005] Im Gegensatz dazu werden mit prokaryotischen Expressionssystemen grosse Mengen des gewünschten Proteins erhalten. Bakterien sind jedoch im Gegensatz zu den eukaryotischen Expressionssystemen nicht in der Lage, die Vorläuferproteine korrekt zu prozessieren. Die Produktion rekombinanen beta -NGFs führt in Bakterien, wie häufig bei der Expression von rekombinanen Säugergenen, zum biologisch inaktiven Translationsprodukt, welches dann in aggregierter Form in der Zelle abgelagert wird (sog.

Inclusion Bodies
(IBs)).

[0006] Die Naturierung von reifem beta -NGF aus derartigen Inclusion Bodies gelingt jedoch nur bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (unter 10 µg/ml) und bei sehr geringen Ausbeuten (bis ca. 10 %). Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in der EP-A 0 544 293, US-Patent 5,606,031, US-Patent 5,235,043 und WO 97/47735. Eine Naturierung über eine Sulfitolyse von neurotrophen Faktoren der NGF/BDNF-Familie wird in der WO 95/30686 beschrieben.

[0007] In der WO 97/47735 wird ein verbessertes Verfahren zur Naturierung von Proteinen beschrieben. In diesem Verfahren wird das inaktive Protein mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration in Gegenwart einer niedermolekularen Substanz, welche Thiolgruppen enthält, gelöst. Das gelöste Protein wird anschliessend aus der stark denaturierenden Lösung in eine nicht oder nur schwach denaturierende Lösung überführt, in welcher es eine biologisch aktive Konformation annimmt, wobei die Disulfidbindungen mit der Thiolkomponente gelöst werden und im Protein intramolekular in der Weise neu gebildet werden, dass das Protein eine Konformation einnimmt, die biologische Aktivität aufweist. Mit einem solchen verbesserten Verfahren kann für beta -NGF eine Naturierungsausbeute von ca.10% erhalten werden.

[0008] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von beta-NGF zur Verfügung zu stellen, welches einfach ist und aktiven NGF in hohen Ausbeuten liefert.

[0009] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Gewinnung eines biologisch aktiven beta-NGF durch Naturierung der in inaktiver schwerlöslicher Form vorliegenden Proform, wobei die Proform (proNGF) vorzugsweise erhältlich ist in Form von Inclusion Bodies nach rekombinanter Herstellung in Prokaryonten, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass der proNGF in seiner inaktiven schwer löslichen Form mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration gelöst wird, anschliessend unter Erhalt der Löslichkeit in eine nicht oder schwach denaturierende Lösung überführt wird und dabei - gelöster denaturierter proNGF eine biologisch aktive Konformation annimmt, die durch die im natürlichen NGF vorliegenden Disulfidbrücken bestimmt ist und anschliessend die Prosequenz abgespalten wird, wobei aktiver NGF erhalten wird, der isoliert werden kann.

[0010] Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Prosequenz bei der Naturierung von inaktivem beta -NGF in vitro einen wesentlichen und positiven Einfluss auf das Naturierungsverfahren hat und es erfindungsgemäss möglich ist, die Renaturierung auf einfachste Weise durchzuführen und dabei dennoch bisher nicht bekannte und für möglich gehaltene Ausbeuten an naturiertem, aktiven beta -NGF zu erhalten.

[0011] Unter proNGF ist beta -NGF zu verstehen, welcher am N-Terminus mit seiner Prosequenz verknüpft ist. Erfindungsgemäss kann als Prosequenz entweder die gesamte Prosequenz (R. H. Edwards und W. J. Rutter, US Patent 5,683,894; A. Ullrich et al. Nature 303, 821(1983), 821; SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138) oder Teile davon, vorzugsweise vollständige Domänen, verwendet werden. U. Suter et al. (EMBO J. 10, 2395 (1991)) haben die in vivo-Funktion des Propeptids von murinem beta -NGF hinsichtlich der korrekten Sekretion in einem COS-7-Zellkultursystem näher untersucht. Dazu wurde die Prosequenz in fünf Bereiche eingeteilt. Es wurden Mutanten hergestellt, in denen ein oder mehrere dieser Sequenzen deletiert wurden. Dabei wurde gefunden, dass die Sequenzbereiche mit den Aminosäuren -52 bis -26 (

Domäne I
) sowie -6 bis -1 (

Domäne II für die Expression und Sekretion von biologisch aktivem beta -NGF essentiell sind. Domäne I ist wichtig für die Expression, während Domäne II die korrekte proteolytische Prozessierung bewirkt. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass proNGF in analoger Weise wie beta -NGF eine Aktivität in vivo zeigt. proNGF kann damit ebenfalls als Therapeutikum verwendet werden.

[0012] Inaktiver, schwer löslicher proNGF entsteht bei der Überexpression des Proteins im Cytosol von Prokaryoten. Rekombinant hergestellter proNGF verbleibt dabei in unlöslicher und aggregierter Form im Cytoplasma. Derartige Aggregate von Proteinen, deren Isolierung und Reinigung sind beispielsweise in F. A. Marston, Biochem. J. 240 (1986) 1-12 beschrieben. Zur Isolierung dieser inaktiven Proteinaggregate (Inclusion Bodies) werden die prokaryotischen Zellen nach der Fermentation aufgeschlossen.

[0013] Der Zellaufschluss kann durch übliche Methoden durchgeführt werden, z.B. mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym (R. Rudolph et al.: *Folding proteins*. In: T.E. Creighton (ed.): *Protein Function: A Practical Approach*. Oxford University Press, pp. 57-99 (1997)). Er wird vorzugsweise in einer zur Einstellung eines neutralen bis schwach sauren pH-Werts geeigneten Pufferlösung als Suspensionsmedium durchgeführt, wie z.B. 0.1 mol/l Tris-HCl. Nach Zellaufschluss werden die unlöslichen Bestandteile (Inclusion Bodies) in beliebiger Weise abgetrennt, vorzugsweise durch Abzentrifugieren oder Filtration nach einem oder mehreren Waschschritten, mit Agentien, die IBs nicht zerstören, fremde Zellproteine jedoch möglichst lösen, z.B. Wasser oder Phosphatpuffer, ggf. unter Zusatz milder Detergentien, wie Brij TM. Anschliessend wird der unlösliche Anteil (Pellet) dem erfindungsgemässen Verfahren zur Solubilisierung und Naturierung unterworfen.

[0014] Als Denaturierungsmittel wird zweckmässig ein für die Solubilisierung von Inclusion Body Proteinen üblicherweise verwendetes Denaturierungsmittel eingesetzt. Bevorzugt werden Guanidiniumhydrochlorid und andere Guanidiniumsalze, wie z.B. Thiocyanat sowie Harnstoff oder dessen Derivate, verwendet. Ferner können Gemische dieser Denaturierungsmittel verwendet werden.

[0015] Die Konzentration des Denaturierungsmittels ist von der Art des Denaturierungsmittels abhängig und für einen Fachmann ohne weiteres feststellbar. Die Konzentration des Denaturierungsmittels (denaturierende Konzentration) ist dann ausreichend, wenn eine vollständige Solubilisierung des denaturierten schwer löslichen Proteins erreicht werden kann. Für Guanidiniumhydrochlorid liegen

diese Konzentrationen üblicherweise bei 3-8 mol/l, vorzugsweise 5 - 7 mol/l. Für Harnstoff liegen die Konzentrationen üblicherweise bei 6-10 mol/l. Unter einer schwach denaturierenden Lösung ist eine Lösung zu verstehen, welche ein Denaturierungsmittel in einer Konzentration enthält, welche die Verknüpfung der korrekten Disulfidbrücken im Protein und damit die Ausbildung der natürlichen Tertiärstruktur des Proteins ermöglicht. Vorzugsweise unterscheiden sich stark und schwach denaturierende Lösungen in der Konzentration um den Faktor 100 oder mehr.

[0016] Zur vollständigen Monomerisierung der Inclusion Body Proteine ist es weiterhin vorteilhaft, während der Solubilisierung zusätzlich ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) oder 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10-400 mM, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 20-100 mM zuzusetzen.

[0017] Nach der Solubilisierung wird vorzugsweise gegen eine Lösung, welche ein Denaturierungsmittel in einer denaturierenden Konzentration enthält, dialysiert, um ggf. eingesetztes Reduktionsmittel zu entfernen. Zweckmäßig enthält die Lösung, gegen die dialysiert wird, das Denaturierungsmittel in der gleichen Konzentration wie die Denaturierungslösung.

[0018] Die anschliessende Naturierung nach dem erfindungsgemässen Verfahren wird im neutralen bis alkalischen pH-Bereich durchgeführt, vorzugsweise zwischen pH 7 und 10, besonders bevorzugt im pH-Bereich zwischen 7.5 und 9.5. Als Pufferlösungen sind alle üblichen Puffer geeignet. Vorzugsweise werden dem Fachmann bekannte Puffer, wie z.B. Tris- oder Phosphatpuffer, als Renaturierungspuffer verwendet. Zur Überführung des denaturierten Proteins in Renaturierungspuffer wird das solubilisierte Protein in den Renaturierungspuffer verdünnt oder gegen Renaturierungspuffer dialysiert. Dadurch wird das Denaturierungsmittel ebenfalls in seiner Konzentration so weit verdünnt (schwach denaturierende Lösung), dass eine weitere Denaturierung des Proteins nicht mehr erfolgt. Bereits während der anfänglichen Erniedrigung der Konzentration des Denaturierungsmittels kann ein Naturierungsprozess erfolgen. Die Bedingungen für die Überführung des Proteins in die nicht oder schwach denaturierende Lösung müssen so gewählt sein, dass das Protein im wesentlichen in Lösung bleibt. Zweckmäßig kann dies durch eine langsame kontinuierliche oder eine schrittweise Verdünnung erfolgen. Dabei ist es bevorzugt, das Denaturierungsmittel so zu verdünnen, dass eine möglichst vollständige Naturierung des Proteins erfolgt, oder das Denaturierungsmittel beispielsweise durch Dialyse nahezu vollständig zu entfernen.

[0019] Die Naturierung erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von niedermolekularen Hilfsstoffen, welche die Ausbeute bei der Naturierung positiv beeinflussen. Derartige Hilfsstoffe sind beispielsweise in R. Rudolph et al., US Patent 5,593,865 beschrieben. Besonders bevorzugt wird als niedermolekularer Hilfsstoff bei der Naturierung Arginin verwendet, zweckmäßig in einer Konzentration von 0.2 bis 1.5 M.

[0020] Die Naturierung nach dem erfindungsgemässen Verfahren erfolgt vorzugsweise unter Zusatz einer Thiolkomponente in reduzierter und oxidierte Form. Bevorzugte Thiolkomponenten sind z.B. Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidierte Form (GSSG), Cysteamin und Cystamin, Cystein und Cystin oder 2-Mercaptoethanol und 2-Hydroxyethylidisulfid. Zusatz dieser Thiolreagentien in reduzierter und oxider Form ermöglicht sowohl die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der sich faltenden Polypeptidkette während der Naturierung als auch das Reshuffling falscher-Disulfidbrücken innerhalb oder zwischen den sich faltenden Polypeptidketten (Rudolph et al. 1997, loc. cit.).

[0021] Das erfindungsgemässen Verfahren wird zweckmäßig während der Naturierung bei niederen Temperaturen (vorzugsweise ca. 10 DEG C) durchgeführt. Bei dem erfindungsgemässen Verfahren wird die Renaturierung während einer Dauer von 0.5-5 h, bevorzugt von 1-2 h, durchgeführt.

[0022] Zur Verhinderung der Oxidation des Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff und zum Schutz freier SH-Gruppen ist es zweckmäßig, einen Komplexbildner, wie EDTA, vorzugsweise in einer Menge von 1-20 mM, besonders bevorzugt um ca. 10 mM zuzusetzen.

[0023] Unter der Aktivität von beta -NGF ist die biologische Aktivität von beta -NGF zu verstehen. Biologisch aktiver beta -NGF liegt als Dimer vor. Die Aktivität kann bestimmt werden nach dem DRG-Test (Dorsal Root Ganglionassay), R. Levi-Montalcini et al., Cancer Res. 14 (1954) 49 und S. Varon et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203. Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien aus Hühnerembryonen an Hand der Ausbildung von Neuriten untersucht.

[0024] Die Prosequenz stellt eine vom reifen Protein getrennte Domäne dar. Zwischen diesen

Domänen befindet sich eine exponierte Proteasespaltstelle. Diese Spaltstellen lassen sich spezifisch mit geeigneten Proteasen schneiden. Trypsin beispielsweise schneidet nach basischen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin. In einem geeigneten Verhältnis von proNGF zu Trypsin wird das korrekt gefaltete, mature Protein nicht von der Protease abgebaut. Denaturierte Proteine und auch Faltungsintermediate hingegen exponieren Sequenzen, die dem Angiff der Protease erliegen. Für die Prozessierung von proNGF werden Proteasen mit Trypsin-ähnlicher Substratspezifität bevorzugt. Diese Proteasen spalten das Protein, ohne den aktiven Teil des Proteinmoleküls abzubauen. Als Trypsin-ähnliche Proteasen kommen verschiedene Serin-Proteasen (z.B. Trypsin selbst oder gamma-NGF) in Frage. Bevorzugt wird Trypsin eingesetzt. Für die limitierte Proteolyse wird das Protein in einem Masse-Verhältnis von 1:40 bis 1:2500 (Verhältnis Trypsin : proNGF) eingesetzt, bevorzugt wird ein Bereich von 1:40 bis 1:250. Die Proteolyse wird mit einer Inkubationszeit von 1 min - 24 h, bevorzugt 1 - 60 min bei einer Temperatur von 0 DEG C bis 37 DEG C, bevorzugt 0 DEG C bis 20 DEG C, durchgeführt. Als Puffer werden solche verwendet, die die Aktivität der Protease nicht hemmen. Bevorzugt sind Phosphat- und Tris-Puffer im Konzentrationsbereich von 10-100 mM. Die limitierte Proteolyse wird im Bereich des pH-Optimums der Protease durchgeführt, bevorzugt ist ein Milieu von pH 7-8. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Proteolyse gestoppt, entweder durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors, bevorzugt 1-5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfuorid) oder Sojabohnen-Trypsininhibitor, bevorzugt 1 mg auf 0.1-5 mg Trypsin oder durch Erniedrigung des pH-Werts auf pH 2-3 durch Zugabe von Säure, bevorzugt HCl (R. Rudolph et al.: *Folding proteins*. In: T.E. Creighton (ed.): *Protein Function: A Practical Approach*. Oxford University Press, pp. 57-99 (1997); R. H. Edwards und W. J. Rutter, US Patent 5,683,894).

[0025] Die folgenden Beispiele, Publikationen und Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Figur 1 zeigt das proNGF-Plasmidkonstrukt pET11a-proNGF für die Expression von rekombinantem humanem proNGF.

Figur 2 zeigt eine Comassie -Färbung eines SDS-PAGE-Gels (15 %) mit Rohextrakten des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) pET11a-proNGF/pUBS520 vor bzw. nach Induktion sowie einer IB-Präparation (SDS-PAGE nach U. K. Laemmli, *Nature* 227, 680 (1970)). U: Rohextrakt vor Induktion, I: Rohextrakt nach vierstündiger Induktion, P: IB-Pellet, S: löslicher Überstand).

Figur 2a zeigt den Einfluss des pH-Werts auf die Faltung von rh-pro-NGF bei 10 DEG C in 100 mM Tris/HCl 1 M L-Arginin, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, 5 mM EDTA. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml, die Faltungsdauer 3 Stunden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Messreihen.

Figur 2b stellt den Effekt unterschiedlicher L-Arginin-Konzentrationen auf die Faltung von rh-pro-NGF dar. Es wurde bei einem pH-Wert von 9.5 renaturiert; die übrigen Bedingungen waren identisch mit denen der bei der pH-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Messreihen.

Figur 2c zeigt den Einfluss verschiedener GSH-Konzentrationen auf die Faltung von rh-pro-NGF. Die GSSG-Konzentration betrug 1 mM, die L-Arginin-Konzentration 1 M. Die übrigen Renaturierungsparameter waren identisch mit denen bei der Arginin-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Messreihen.

Figur 2d zeigt den Einfluss verschiedener GSSG-Konzentrationen auf die Renaturierung von rh-proNGF. Die GSH-Konzentration betrug 5 mM. Die restlichen Faltungsparameter waren identisch mit denen bei der GSH-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Messreihen.

Figur 2e stellt den Einfluss verschiedener GdmCl-Gehalte auf die Ausbeute von nativem rh-pro-NGF dar. Der Gehalt an GSH bzw. GSSG betrug 5 mM bzw. 0.5 mM. Die anderen Renaturierungsbedingungen waren identisch mit denen bei der GSSG-Variation benutzt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Messreihen.

Figur 2f zeigt den Effekt unterschiedlicher Proteinkonzentrationen auf die Faltungsausbeute von rh-*pro*-NGF. Die GdmCl-Konzentration betrug in allen Ansätzen 200 mM. Alle anderen Faltungsparameter waren identisch mit denen bei der GdmCl-Variation verwendeten. Dargestellt ist eine Messreihe.

Figur 3 zeigt das Elutionsprofil der Reinigung von rh-proNGF mittels Kationen-

Austauschchromatographie an Poros 20 HS (Perspective Biosystems, Säulenvolumen 1.7 ml).

Figur 4 zeigt ein SDS-PAGE-Gel (15 %, Silberfärbung nach M. V. Nesterenko, M. Tilley und S. J. Upton, J. Biochem. Biophys. Methods 28, 239 (1994)) der Reinigung von rh-proNGF an Poros 20 HS (1: Auftrag rh-proNGF-Renaturat, 2: Durchlauf, 3: Fraktion 4 (66 bis 69 ml), 4: Fraktion 5 (69-72 ml), 5: Fraktion 6 (72-75 ml), 6: Fraktion 7 (75-78 ml), 7: Fraktion 8 (78-81 ml), 8: Fraktion 9 (81-84 ml), 9: Fraktion 10 (84-87 ml))

Figur 5 zeigt das UV-Spektrum von rh-proNGE.

Figur 6 zeigt ein IEX-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF (Säulenmaterial: Poros 20 HS, 100 mm x 4,6 mm Säule, Fa. Perseptive Biosystems).

Figur 7 zeigt ein RP-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF bei 220 nm (Säule Poros 10 R1; 100 mm x 4.6 mm; Perseptive Biosystems).

Figur 8 zeigt ein SDS-Gel (15 %, Coomassie-Färbung) der limitierten Proteolyse von rh-proNGF mit Trypsin (M: 10 kDa-Marker, 1: rh-proNGF-Standard, 2: rh- beta -NGF-Standard, 3: Masseverhältnis Trypsin : rh-proNGF= 1 : 40, 4: 1 : 100, 5:1 : 250, 6: 1 : 500, 7: 1 : 1000, 8: 1 : 2000, 9: 1 : 2500, 10: Kontrolle ohne Trypsin, mit STI).

SEQ ID NO:1 und 2 zeigen Oligonukleotide zur Konstruktion von pET11a-proNGF.

SEQ ID NO:1 und 2 zeigen die Nukleotidsequenz der cDNA von humanem proNGF sowie die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

SEQ ID NO:4 zeigt die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

Beispiel 1

Klonierung der proNGF-cDNA in einen *Escherichia coli*-Expressionsvektor

[0026] Für die Klonierung des proNGF-Konstrukt wurde das T7-Expressionssystem von Novagen gewählt (F.W. Studier und B.A. Moffatt, J. Mol. Biol. 189, (1986) 113). Die für proNGF codierende DNA-Sequenz steht unter der Kontrolle des starken T7 Transkriptionssignals. Als Wirtsstamm wird *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Das Chromosom enthält das Gen für die T7 RNAPolymerase. Die Expression dieser RNAPolymerase und damit des rh-proNGFs wird durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) induziert.

[0027] Die cDNA für humanen proNGF wurde durch PCR-Amplifikation aus dem Vektor pMGL-SIG-proNGF von Boehringer Mannheim erhalten (PL-Nr. 1905). Durch Mutageneserprimer wurde am 5'-Ende der für proNGF codierenden DNA-Sequenz eine NdeI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in die NdeI/BamHI-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pET11a (Novagen) inseriert (Fig. 1).

[0028] Es wurden folgende Primer für die PCR benutzt:

Forward Primer

FwProNGF

2

Reverse Primer

Revised RevNGF

1

[0031] Nach der Klonierung in den Vektor wurde die Nucleotidsequenz mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Beispiel 2

a) Expression von humanem proNGF in *E. coli*

[0032] Für die Anzucht des rekombinanten Bakterienstamms wurde eine Übernachtkultur bereitet. Dazu wurde ein geeignetes Volumen LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin versetzt.

LB-Medium (1 l): 10 g Trypton,
10 g Hefeextrakt,
5g NaCl.

[0033] Das Medium wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 DEG C geschüttelt.

[0034] Am nächsten Morgen wurde das gewünschte Volumen 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin im Verhältnis 1:100 (v/v) mit der Übernachtkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 DEG C und 200-250 rpm geschüttelt, bis eine OD600 von 0.5-0.8 erreicht war. Danach wurde die Expression von proNGF mit 3 mM IPTG 4 h lang bei gleicher Temperatur induziert. Anschliessend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und entweder sofort aufgeschlossen oder bei -70 DEG C eingefroren.

2xYT-Medium (1 l): 17 g Trypton,
10 g Hefeextrakt,
5 g NaCl.

b) Isolierung der IBs

[0035] Das rekombinante Protein fällt in den Bakterienzellen in aggregierter Form an. Die Präparation dieser Inclusion Bodies wurde durchgeführt nach R. Rudolph et al.: Folding Proteins. In: T. E. Creighton (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99.

[0036] Für den Zellaufschluss wurden jeweils 5 g Zellpellet in 25 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 1 mM EDTA resuspendiert. Danach wurden 1.5 mg Lysozym pro g Zellfeuchtmasse hinzugegeben, 30 min bei 4 DEG C inkubiert und die Zellen anschliessend mit dem Gaulin-Zellaufschlussgerät aufgebrochen. Dann wurden 3 mM MgCl₂ sowie 10 mu g/ml DNase zum Robhomogenat gegeben und 30 min bei 25 DEG C inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zugabe von 0.5 Volumenanteilen 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1.5 M NaCl pH 7.0 und anschliessende dreissigminütige Inkubation bei 4 DEG C solubilisiert. Die IBs wurden 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Sie wurden dann noch viermal mit je 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 20 mM EDTA gewaschen und bei -20 DEG C aufbewahrt.

[0037] Aus 10 l E. coli-Kultur (ca. 44 g Zellfeuchtmasse) wurden auf diese Weise reproduzierbar ca. 4 g IB-Pellet erhalten. Die Präparationen enthielten stets etwa 90-95% rh-proNGF (Fig. 2).

Beispiel 3

a) Solubilisierung der IBs

[0038] 400 mg IB-Pellet wurden in 2 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0; 6 M GdmCl; 100 mM DTT; 10 mM EDTA) suspendiert, 2 h bei 25 DEG C inkubiert und 30 min bei 13.000 rpm im Kühlraum abzentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand abgenommen und mit 1 M HCl auf pH 3-4 gebracht. Das Solubilisat wurde dreimal gegen 300 ml 6 M GdmCl pH 4.0; 10 mM EDTA dialysiert, und zwar zweimal je 2 h bei 25 DEG C und einmal über Nacht im Kühlraum (12 DEG C; 16-18 h). Die Proteinkonzentration wurde dann nach der Bradford-Methode bestimmt (M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248 (1976)). Die Konzentration an rh-proNGF betrug zwischen 40 und 50 mg/ml.

b) Optimierung der Renaturierung von rh-proNGF

[0039] Zur Darstellung von biologisch aktivem rh-pro-NGF aus den in Beispiel 3a) hergestellten Solubilisaten wurden diese in verschiedene Renaturierungspuffer verdünnt. Zur Ermittlung der optimalen Faltungsbedingungen wurden folgende Parameter in der angegebenen Reihenfolge variiert:

- a) Temperatur und Zeit,
- b) pH-Wert,
- c) Arginin-Konzentration,
- d) GSH/GSSG-Konzentration,
- e) GdmCl-Konzentration,
- f) Proteinkonzentration.

[0040] Die Ergebnisse sind in Tabellen 1-2 sowie Fig. 2a-f dargestellt. Die Menge an renaturiertem rh-proNGF in den Faltungsansätzen wurde mit RP-HPLC bestimmt. Dazu wurden zu bestimmten Zeiten je 925 µl der Faltungsansätze mit 75 µl 32%iger HCl versetzt und dadurch die Faltungsreaktion gestoppt. Für die RP-HPLC-Analytik wurde eine Poros 10 R1-HPLC-Säule und das HPLC-System Beckman Gold mit 125NM Solvent Module, 168 Detektor, Autosampler 507 und Auswertesoftware Gold V 8.10 verwendet. Die erhaltenen Elutionspeaks wurden mit dem Programm Peakfit, Version 2.01, gefittet. Zur quantitativen Bestimmung der Ausbeuten wurde eine Eichgerade mit gereinigtem, nativem rh-proNGF erstellt. Da die rh-proNGF-IBs sehr sauber waren, wurde bei der quantitativen Auswertung die zur Renaturierung eingesetzte Gesamtproteinmenge mit der von rh-pro-NGF gleichgesetzt. Bei den dargestellten Messergebnissen handelt es sich um Durchschnittswerte aus je zwei Messungen.

Id=Tabelle 1 Columns=4

Optimierung von Temperatur und Zeit bei der rh-pro-NGF-Faltung. Die Proteinkonzentration betrug in jedem Renaturierungsansatz 50 µg/ml. Der Faltungspuffer bestand aus 100 mM Tris/HCl pH 9.5, 1 M L-Arginin, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, 5 mM EDTA.

Die Messreihen wurden mehrfach durchgeführt und mit einer Exponentialfunktion gefittet. Dargestellt sind die Durchschnittsergebnisse zweier Messungen.

Head Col 1: Temperatur [DEG C]

Head Col 2: Endausbeute [%]

Head Col 3: Plateau erreicht nach ca.

Head Col 4: Geschwindigkeitskonstante k [s]

425.83.3 h2.596 x 10 s

1029.01.6 h4.865 x 10 s

1522.41.1 h6.399 x 10 s

2012.01.0h1.065 x 10 s

2511.40.8 h1.935 x 10 s

Id=Tabelle 2 Columns=3

Hier ist der Einfluss verschiedener GSH/GSSG (GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion) auf die Faltung von rh-pro-NGF dargestellt. Als Renaturierungspuffer wurde

100 mM Tris/HCl pH 9.5,

1 M L-Arginin,

5 mM EDTA

verwendet. Die Faltungsdauer betrug 3 h bei 10 DEG C. In der Tabelle sind die einzelnen Faltungsansätze nach abnehmender Ausbeute geordnet. Angegeben sind die durchschnittlichen Ausbeuten aus zwei Messreihen.

Head Col 1: Nr. des Ansatzes

Head Col 2: GSH/GSSG-Verhältnis [mM]

Head Col 3: Ausbeute [%]

15/0.537.7

25/135.0

35/534.0

45/2.533.1
51/129.4
65/1027.6
75/2026.0
82.5/122.1
910/121.2
101/518.9
1120/110.9
120/19.85
130/00
145/00

c) Renaturierung von rh-proNGF im präparativen Massstab

[0041] Rh-proNGF wurde durch Verdünnung in Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9.5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 0.5 mM (GSSG; 5 mM EDTA) renaturiert. Dabei wurde bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml gefaltet. Der Renaturierungsansatz wurde 3 h bei 10 DEG C inkubiert.

d) Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

[0042] Das Renaturat wurde gegen 10 l 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA (IEX-Puffer A) dialysiert und 30 min bei 20000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Poros 20 HS-Säule (1.7 ml) aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten eluiert (IEX-Puffer B: 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 M NaCl; 1 mM EDTA). Das Protein eluiert bei 980 mM NaCl (Fig. 3). Nicht nativer rh-proNGF lässt sich nur unter denaturierenden Bedingungen von der Säule entfernen.

Beispiel 4

Charakterisierung von rh-proNGF

a) Konzentrations- und Molekulargewichtsbestimmung mit UV-Spektralphotometrie

[0043] Zur Konzentrationsbestimmung von rh-proNGF in den gereinigten Proben wurde ein UV-Spektrum von 240 bis 340 nm von gegen 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysierten Proben gemessen (Fig. 5; das Spektrum wurde aufgenommen mit einem Beckman DU 640 Spectrophotometer). Die rh-proNGF-Konzentration der Probe wurde aus der Absorption bei 280 nm bestimmt. Für die Berechnung wurde ein theoretischer molarer Extinktionskoeffizient von 256801/ (mol·cm) (berechnet nach S. C. Gill und P. H. von Hippel, Anal. Biochem. 182, 319 (1989)) und das Molekulargewicht von 24869 Da pro Monomer (berechnet mit dem ExPASy-Programm pi/Mw und korrigiert für drei Disulfidbrücken) zugrundegelegt. Die durch das Spektrum ermittelten Werte stimmten gut mit den durch die Bradford-Methode bestimmten Konzentrationen überein. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie. Die theoretische Masse von rekombinantern proNGF beträgt 24869 Da. Experimentell wurden 24871 Da erhalten.

b) Reinheitsanalyse und Molekulargewichtsbestimmung mit SDS-Polyacrylamidgelektrophorese

[0044] Es wurden 15%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Proben enthielten jeweils 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol. Rekombinanter humaner proNGF zeigt im SDS-Gel ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht als erwartet: ca. 30 kDa (statt 24.8 kDa) (Fig. 2).

d) Reinheitsanalyse mit IEX-HPLC

[0045] 24 µg (50 µg einer Probe mit 0.48 mg/ml rh-proNGF) Protein wurden auf eine mit 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA äquilibrierte Poros 20 HS-Säule aufgetragen (125 x 4 mm) und bei einer Flussrate von 5 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % B (B = 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 2 M NaCl; 1 mM EDTA) in 10 Minuten eluiert (Fig. 6). Zur Detektion wurde die Absorption bei 280 nm benutzt (Gyncotek-HPLC-System mit Auswertesoftware Chromeleon Version 3.14).

e) Reinheitsanalyse mit RP-C4-HPLC

[0046] 3.1 μ g rh-proNGF (15 μ g rh-proNGF mit einer Konzentration von 0.21 mg/ml) wurden auf eine mit 0.13% (v/v) TFA äquilibrierte Poros 10 R1-Säule (100 mm x 4.6 mm; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Protein wurde bei einer Flussrate von 0.8 ml/min mit einem nicht-linearen Gradienten innerhalb von 33 min eluiert (0-4 mm: 6% B; 4-9 mm: 6-30% B; 9-24 min: 30-69% B; 24-25 min: 69-100% B; 25-27 min: 100% B; 27-30 min: 100% B). Als Laufmittel B wurde 0.1% (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption bei 220 nm herangezogen (Beckman Gold HPLC-System mit Auswertesoftware Gold V 8.10).

7) Nativer rh-proNGF eluierte in einem einzigen Peak bei einer Retentionszeit von 14.28 min (Fig.

f) N-terminale Sequenzanalyse

[0047] Für die N-terminale Sequenzanalyse wurden die mittels RP-HPLC grob gereinigten, solubilisierten IBs verwendet. Die N-terminale Sequenz wurde mit einem Applied Biosystems 476A Protein Sequencer bestimmt. Es wurde folgende Aminosäuresequenz erhalten:

H2N-Met-Glu-Pro-His-Ser-Glu-Ser-Asn-Val

g) Biologische Aktivität des rekombinanten humanen proNGF

[0048] Die physiologische Aktivität von rh-proNGF wurde mit dem DRG-Test (= dorsal root ganglion assay) überprüft (R. Levi-Montalcini, H. Meyer und V. Hamburger, Cancer Res. 14, 49 (1954); S. Varon, J. Nomura, J. R. Perez-Polo und E. M. Shooter, Meth. In Neurochemistry 3, 203 (1972)). Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien von 7-8 Tage alten Hühnerembryonen anhand der Ausbildung von Neuriten untersucht. Die rh- proNGF-Probe wurde mit Kulturmedium auf Konzentrationen von 0.019 bis 20.00 ng/ml eingestellt. Es wurden 15000 Neuronen pro Testansatz eingesetzt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 DEG C wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt. Als Referenz wurde eine Lösung von rh- beta -NGF mit bekannter Konzentration hinzugezogen. Bei der quantitativen Auswertung bezieht man sich auf den sogenannten EC50-Wert, d.h. derjenigen NGF-Konzentration, bei der die Hälfte aller Neuronen überleben. Für rh-proNGF ergibt sich ein EC50-Wert von 0.369 ng/ml. Im Vergleich dazu beläuft sich der EC50-Wert für den rh- beta -NGF-Standard auf 0.106 ng/ml. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Molekulargewichte von rh- beta -NGF und rh-proNGF, so ergibt sich für reifen rh- beta -NGF eine etwa doppelt so grosse biologische Aktivität wie für rh-proNGF.

Beispiel 5

a) Gewinnung von biologisch aktivem, reifen rh- beta -NGF durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF

[0049] Menschlicher proNGF besitzt als letzte Aminosäure der Prosequenz ein Arginin. Daher kann in vitro aus dieser Vorstufe durch limitierte Proteolyse mit Proteasen geeigneter Substratspezifität wie beispielsweise Trypsin reifer rh- β -NGF erhalten werden.

[0050] 500 μ l gereinigter rh-proNGF wurde gegen 50 mM Tris/HCl pH 8.0 dialysiert. Nach der Dialyse wurde mittels Aufnahme des UV-Spektrums eine Proteinkonzentration von 0.49 mg/ml gemessen. Pro Verdau-Ansatz wurden 20 μ g proNGF eingesetzt. Davon wurden nach der Proteolyse 3 μ g (entspricht 6 μ l) mittels SDS-PAGE analysiert. Als Trypsin-Stammlösungen wurden 0.1 μ g/ml bzw. 0.01 μ g/ml verwendet. Die Konzentration des Sojabohnen-Trypsin-Inhibitors (STI) betrug 1 mg/ml. Beide Proteine lagen als Lyophilisate vor (Hersteller: Boehringer Mannheim bzw. Sigma) und wurden in obigem Puffer gelöst.

[0051] Für die limitierte Proteolyse wurden unterschiedliche Trypsin/rh-proNGF-Masseverhältnisse eingesetzt (s. Tabelle 3). Nach dreissigminütiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit je 5 μ g STI abgestoppt. Als Kontrolle wurde rh-proNGF ohne Zugabe von Protease ebenfalls auf Eis inkubiert und anschliessend mit STI versetzt.

Id=Tabelle 3 Columns=5

Head Col 1: Verhältnis Trypsin:rh-proNGF

Head Col 2: m(Trypsin) [μ g]

Head Col 3: V(Trypsin) [μ l]

Head Col 4: V(rh-proNGF) [μ l]

Head Col 5: V(STI) [μ l]

1 : 400.55 (0.1 μ g/ml)405

1 : 1000.22 (0.1 μ g/ml)405

1 : 2500.080.8 (0.1 μ g/ml)405

1 : 5000.044 (0.01 μ g/ml)405

1 : 10000.022 (0.01 μ g/ml)405

1 : 20000.011 (0.01 μ g/ml)405

1 : 25000.0080.8 (0.01 μ g/ml)405

Kontrolle--202.5

b) Analyse der Spaltprodukte durch N-terminale Sequenzierung

[0052] Die Verdauansätze mit einem Massenverhältnis Trypsin : rh-proNGF von a) 1 : 40; b) 1 : 100 und c) 1 : 250 wurden durch N-terminale Sequenzierung näher untersucht. Bei den beiden oberen Proteinbanden in dem SDS-PAGE-Gel (Abb. 8) handelt es sich um Trypsin (24 kDa) bzw. STI (20.1 kDa). In der Bande bei 13 kDa fanden sich mehrere Spezies:

N-Terminus 1: Met....;

N-Terminus 2: Val...;

N-Terminus 3: Ser...(reifer rh- beta -NGF);

N-Terminus 4: Gly... .

[0053] Diese Peptide waren in den verschiedenen Ansätzen in unterschiedlichem Ausmass vorhanden.

Ansatz a): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 : N-Terminus 4 = 4 : 5 : 2.

Ansatz b): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 = 1 : 1; N-Terminus 4 in Spuren.

[0054] Ansatz c) wurde zusätzlich mittels RP-C3-HPLC analysiert (Säule: Nucleosil 500-5 C3-PPN; 125mm x 4 mm). Dabei fanden sich zwei Peaks: Peak 1 (12.32 min): N-Terminus 1; Peak 2 (14.88 mm): N-Terminus 2 und N-Terminus 3 im Verhältnis 2 : 3.

[0055] Zur Gewinnung von maturem rh- beta -NGF aus rh-proNGF im präparativen Massstab wurden 1.3 mg rh-proNGF (in 50 mM Tris/HCl pH 8.0; Konzentration 0.46 mg/ml) im Masseverhältnis 1:250 (Trypsin : rh-proNGF) mit Trypsin versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Protease mit einem 40-fachen Masseüberschuss an Sojabohnen-Trypsininhibitor desaktiviert. Der Spaltansatz wurde gegen 50 mM Natriumphosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysiert und anschliessend auf eine Kationen-Austauschersäule (1.7 ml Poros 20 HS; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Spaltprodukt eluierte in einem einzigen Peak in einem linearen Salzgradienten von 0 bis 2 M NaCl. Die Elution bei einer Salzkonzentration von etwa 840 mM NaCl entsprach derjenigen von maturem rh- beta -NGF in einem Kontrollexperiment. Die Ausbeute an gereinigtem Spaltprodukt betrug 17%.

[0056] Die biologische Aktivität des gereinigten Spaltprodukts wurde mittels DRG-Assay getestet. Diese stimmte mit der Aktivität von reifem rh- beta -NGF überein (Tab. 4).
Id=Tabelle 4 Columns=2

Head Col 1: Spezies

Head Col 1: Species

Read cover 2000
rh- beta -NGF110

rh- beta -NGF, hergestellt durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF171

Referenzliste

Barnett, J. et al., J. Neurochem. 57 (1991) 1052
 Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248
 EP-A 0 544 293
 Hefti, F. J., J. Neurobiol. 25, (1994) 1418
 Hill, S. C. und von Nippel, P., Anal. Biochem. 182 (1989) 319
 Laemmli, U. K., Nature 227 (1970) 680
 Levi-Montalcini, R., et al., Cancer Res. 14 (1954) 49
 Levi-Montalcini, R., Science 237 (1987) 1154
 Marston, F.A., Biochem. J. 240 (1986) 1 - 12
 Nesterenko, M. V. et al, J. Biochem. Biophys. Methods 28 (1994) 239
 Rudolph, R. et al. (1997): Folding Proteins. In: T. E. Creighton (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99
 Schmelzer, C. H. et al., J. Neurochem. 59 (1992) 1675
 Studier, F.W. et al, J. Mol. Biol. 189 (1986) 113
 Suter, U. et al., EMBO J. 10 (1991) 2395
 SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138
 Thoenen, H. et al, Physiol. Rev. 60 (1980) 1284
 Ullrich, A., et al., Nature 303 (1983) 821
 US-Patent 5,235,043
 US-Patent 5,593,856
 US-Patent 5,606,031
 US-Patent 5,683,894
 Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203
 WO 97/47735
 Yankner, B. A., et al., Annu. Rev. Biochem. 51 (1982) 845

Data fra esp@cenet test databasen - l2